

# ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA DE JUSTICIA SPICIGERA

ELISA VEGA-ÁVILA<sup>A\*</sup>, RAFAELA TAPIA-AGUILAR<sup>A</sup>, RICARDO REYES-CHILPA<sup>B</sup>, SILVIA LAURA GUZMÁN-GUTIÉRREZ<sup>B</sup>, JAVIER PÉREZ-FLORES<sup>B</sup> Y RODOLFO VELASCO-LEZAMA<sup>A</sup>.

(Recibido Junio 2012; Aceptado Agosto 2012)

## ABSTRACT

*Justicia spicigera* is a native plant from Mexico used since prehispanic times to treat dysentery. The aim of this research was to evaluate the effect of ethanol extract (EE) and its hexanic fraction (HEE) on bacteria causing dysentery, as well as on *Staphylococcus aureus* and the yeast *Candida albicans*. The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined by resazurin assay. The EE inhibited the growth of *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*  $\text{MIC} \leq 2.5 \text{ mg/mL}$ . The HEE inhibited bacterial growth  $\text{MIC} \leq 1.25 \text{ mg/mL}$ . This fraction also inhibited *Candida albicans* with  $\text{MIC} = 0.25 \text{ mg/mL}$ . These results support the empirical use of *Justicia spicigera* to dysentery treatment. The volatile compounds of the HEE, a fragrant yellow oil, were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry and identified by the NIST library: 3-pentenal,4-methyl; butanoic acid, 2-hydroxi-2-methyl-,methyl ester; ethanone, 1-(3-ethyloxiranyl)-; 1-butanol,4-(1-methylethoxy)-; 2-hydroxy-2-methylbutyric acid; 3-butene-1,2-diol, 1-(2-furanyl)-; 2-hexenoic acid ethyl ester; 3-thiopheneacetic acid; 1,2-benzendicarboxilic acid, mono (2-ethylhexyl) ester; benzene, 1,1'-(1-phenyl-1,2-ethenediyil) bis[4-methoxy]. None of these compounds have been reported previously from *Justicia spicigera*. [www.relaquim.com](http://www.relaquim.com)

**Key words:** *Justicia spicigera*, dysentery, volatile compounds, resazurin.

## RESUMEN

*Justicia spicigera* es una planta nativa de México que se emplea desde la época prehispánica para tratar la disentería, por lo que objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del extracto etanólico y su fracción hexánica sobre microorganis-

<sup>A</sup>Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, San Rafael Atlixco 184, Col. México 09340. México.

<sup>B</sup>Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito exterior, Ciudad Universitaria, México 04510, México.

\*Elisa Vega-Ávila. Fax: 55-5804-4727 e-mail: vega@xanum.uam.mx

mos causantes de la disentería bacteriana así como en *Staphylococcus aureus* y la levadura *Candida albicans*. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) del extracto etanólico y su fracción mediante el método de la resazurina. El extracto etanólico en concentraciones  $\leq 2.5$  mg/mL inhibió el crecimiento de *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. La fracción hexánica inhibió el crecimiento de las bacterias en concentraciones  $\leq 1.25$  mg/mL, así como el de *Candida albicans* (0.25 mg/mL). Estos resultados apoyan el uso empírico de *Justicia spicigera* en el tratamiento de la disentería.

La fracción hexánica es un líquido amarillo, aromático y se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, se compararon los espectros con la colección NIST y se detectaron los siguientes compuesto: 4-metil-3-pentenal; 2-hidroxi-2-metil-butanoato de metilo; 3,4-epoxi-2-hexanona; 1,2-diol-(2-furanil)-3-buteno; 3,4-epoxi-2-hexanona; 4-(1-metiletoxi)-1-butanol; ácido 2-hidroxi-2-metil-butanoico; 2-hexenoato de etilo; ácido 3-tiofen-acético; ácido ftálico-2-etil-butil éster; 1-fenil-1,2-di-(4-metoxifenil)-eteno. Estos compuestos no se han reportado previamente en *Justicia spicigera*. [www.relaquim.com](http://www.relaquim.com)

**Palabras clave:** *Justicia spicigera*, disentería, compuestos volátiles, resazurina.

## INTRODUCCIÓN

Las infecciones de las vías respiratorias y del tracto intestinal son las dos principales enfermedades en el grupo de niños mexicanos de 0 a 14 años. Durante el año 2010, las infecciones respiratorias representaron el 76.5 % en tanto que las infecciones intestinales constituyeron el 11.4 % (INEGI, 2012). A pesar de que en la antigüedad no se conocía la existencia de los microorganismos y su papel en la generación de infecciones ya se empleaban las plantas *Melissa officinalis*, *Alium sativum* y *Melaleuca alternifolia*, para el tratamiento de enfermedades infecciosas comunes, en la actualidad se reconoce a estas plantas como agentes antimicrobianos de amplio espectro (Heinrich *et al.*, 2004).

México es un país donde la medicina tradicional aun juega un papel importante en el cuidado y preservación de la Salud, por lo que las plantas medicinales, ofrecen posibilidades para descubrir moléculas con actividad antimicrobiana (Ríos *et al.*, 2003). *Justicia spicigera* (muitle, muicle, hierba

tinta) es una planta endémica de Mesoamérica, que crece desde México hasta el sur de Colombia y se emplea en México desde la época prehispánica para tratar la disentería, gonorrea, sarna, fiebre y sangrado uterino (Hernández, 1790). Actualmente se sigue empleando con fines medicinales para tratar el cáncer, enfermedades circulatorias, diarrea, nervios, reumatismo, inflamación de estómago y dolor de cabeza, (Andrade-Cetto, 2009). Además, en combinación con *Arnica montana*, *Hippocratea excelsa*, *Amphipterygium adstringens* y *Tecoma stan* se elabora el té que se usa en la terapia alternativa/complementaria en pacientes seropositivos a VIH (Herrera-Arellano *et al.*, 2009). En la medicina tradicional de Guatemala se emplea para tratar infecciones como erisipela, leucorrea y pielonefritis causada principalmente por bacterias y hongos (Cáceres *et al.*, 1987). *Justicia spicigera* tiene la sinonimia de *Jacobina spicigera* (Euler & Alam, 1982).

Se han conducido diversos estudios para conocer la actividad biológica de los extractos de *J. spicigera* y se ha reportado

que el extracto etanólico de las hojas en una concentración de 417 µg/mL causa la muerte del 97± 2 % de trofozoítos de *Giardia duodenalis*, e induce cambios morfológicos en el 98 % de los trofozoítos (Ponce-Macotela *et al*, 2001). El extracto hexánico de *J. spicigera*, en concentración de 500 g/L, inhibe el 100% de los trematodos de *Fasciola hepática* (Ibarra-Moreno *et al*, 2012). El extracto acuoso de *J. spicigera* en una concentración de 100 mg/mL mostró ser citotóxico en células leucémicas en tanto que no afectó la proliferación de células normales precursoras de la hematopoyesis (Cáceres-Cortés *et al*, 2001). La actividad citotóxica del extracto etanólico se observó en cultivos de células T47D ( $ED_{50}$ = 0.43 µg/mL) y HeLa ( $ED_{50}$ =5.59µg/mL) (Vega-Avila *et al*, 2009).

La actividad antimicrobiana de los extractos metanólico y etanólico ha sido probado por dos grupos de investigadores empleando la prueba de difusión en agar en cultivos de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *B. subtilis* (Gómez-Verjan *et al.*, 2012) por lo que el objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto del extracto etanólico y su fracción hexánica sobre cepas de bacterias responsables de la disentería bacteriana, así como en *Staphylococcus aureus* y la levadura *C. albicans*, empleando a la resazurina como indicador de viabilidad celular y determinar los compuestos volátiles presentes en la fracción.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Material vegetal:** Se adquirió la planta fresca en el Mercado de Sonora de la Ciudad de México. Se depositaron ejemplares en el herbario de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa siendo clasificada, por el Dr. Adolfo Espejo Serna como *Justicia spicigera* y se le asignó el número de voucher UAMIZ 65465.

**Obtención de los extractos:** La planta completa se secó y molió y con ella se obtuvieron los extractos por maceración

sucesiva durante 48 horas con hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol. Los disolventes se evaporaron por rotovaporación (Bucki II, Suiza).

**Fraccionamiento del extracto etanólico:** El extracto etanólico se disolvió en una disolución de carbonato de sodio y posteriormente se maceró con hexano para obtener la fase orgánica. Se eliminó el hexano por rotovaporación y la fracción se almacenó a 4 °C hasta su uso.

**Determinación de la actividad antibacteriana:** Las bacterias usadas para el ensayo antimicrobiano fueron obtenidas del cepario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Las cepas empleadas fueron *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Salmonella typhi* (ATCC 6539), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) y *Shigella flexneri* (ATCC 29003).

Se determinó la actividad antibacteriana midiendo la concentración mínima inhibitoria (MIC) empleando el método de la resazurina (Sarker *et al.*, 2007), como indicador de viabilidad ya que es un indicador de oxido-reducción que al ser reducido a resorufina por las enzimas oxidoreductasas, sólo activas en células vivas, cambia su tonalidad de azul a rosa.

El extracto y la fracción hexánica se disolvieron en dimetisulfóxido (DMSO) en concentración de 10 mg/mL de DMSO al 10%, y con ellas se realizaron una serie de diluciones dobles en 8 pozos consecutivos, por triplicado, en una placa de 96 pozos utilizando como disolvente solución salina fisiológica estéril. El intervalo de las concentraciones empleadas en este ensayo fue de 5.0 a 0.039 mg/mL. Se colocaron en cada pozo 50 µL de la dilución del extracto o fracción, 10µL de la suspensión de bacterias viables ( $4 \times 10^6$  UFC/mL), 10 µL de resazurina sódica (0.675% p/v en agua) y 30 µL de medio de cultivo Mueller-Hinton 3x (MH3x). Las placas se incubaron a 37 °C durante 20 horas. Se emplearon controles negativos (DMSO, agua) y positivo

(mezcla de penicilina/estreptomicina). Se realizaron 3 experimentos independientes y el valor medio de la concentración mínima inhibitoria (MIC) se muestra en la Tabla 1. El MIC corresponde a la concentración más baja del extracto o fracción donde ocurre el cambio de color (Sarker *et al.* 2007).

**Determinación de la actividad antifúngica:** Para este ensayo se obtuvo la levadura *Candida albicans* (ATCC 10231) del cepario de la Escuela Nacional del Instituto Politécnico Nacional. La concentración mínima inhibitoria (MIC) se obtuvo siguiendo el protocolo M27-A2 establecido por la NCCLS (Siglas en inglés del *National Committee for Clinical Laboratory Standards*), determinando colorimétricamente la concentración mínima inhibitoria (Liu *et al.*, 2007). Se realizaron una serie de diluciones dobles del extracto y de la fracción hexánica en 8 pozos consecutivos, por triplicado, en una placa de 96 pozos, utilizando como disolvente medio RPMI-1640 con glutamina y sin bicarbonato sódico, tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) 0.164 M, a pH 7.0. Las diluciones de cada extracto se pusieron en contacto con una concentración estándar de células viables de 1 a  $5 \times 10^3$  UFC/mL en el mismo medio

suplementado con 0.1 % v/v de la disolución estéril de resazurina sódica (20 mg/mL en agua). Además, en cada placa se colocó como control negativo DMSO al 1 % y como control positivo una serie con una mezcla de antibiótico-antimicótico (10,000 Unidades de penicilina/mL; 1000 µg/mL de estreptomicina; 25.0 µg/mL de anfotericina B). Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 horas y después de este tiempo se determinó la concentración más baja del extracto o fracción a la cual ocurre el cambio de color. La prueba se realizó por triplicado en tres eventos independientes. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 1.

**Cromatografía de gases:** Se empleó un cromatógrafo de gases 6890 N (Agilent, EUA) acoplado a un espectrómetro de masas Jeol JMS-GC mate II, equipado con una columna HP-5 (30 m, 0.32 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de película), en un programa de 40 °C (1 min) hasta 305 °C, a 8 °C/min. El inyector se mantuvo a 305 °C, el volumen de inyección fue de 0.5 µL en modo Split, y el flujo de gas portador (He) en la columna fue de 1 mL/min. La interfase entre el cromatógrafo y espectrómetro se mantuvo a 305 °C; el

**Tabla 1.** Concentración mínima inhibitoria (mg/mL) del extracto etanólico y la fracción hexánica de *Justicia spicigera* sobre microorganismos causantes de infecciones.

Microorganismo	A	B	C	D	E	F
Extracto	1.25	1.25	0.625	2.5	1.25	S.A
Fracción	0.156	0.625	0.078	2.0	1.25	0.25
Penicilina UI/mL	39.06	0.019	1.22	4.88	9.76	---
Estreptomicina, µg/mL	39	0.019	1.22	4.88	9.76	
Penicilina UI/mL	--	--	--	--	--	*
Estreptomicina, µg/mL						
Anfotericina B, µg/mL						

A = *Shigella flexneri* (ATCC 29003). B = *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028). C = *Salmonella typhi* (ATCC 6539). D = *Escherichia coli* (ATCC 8739).

E = *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). F = *Candida albicans* (ATCC 6538).

S.A = Sin actividad.

\*Se requiere de más estudios para definir el valor de MIC.

**Tabla 2.** Componentes identificados en la fracción hexánica obtenida del extracto etanólico de *Justicia spicigera*.

No.	Compuesto	Tr (min)
1	4-metil-3-pentanal	4.1
2	2-hidroxi-2-metil-butanoato de metilo	4.77
3	3,4-epoxi-2-hexanona	5
4	4-(1-metiletoxi)-1-butanol	6.07
5	Ácido 2-hidroxi-2-metil-butanoico	7.21
6	1,2-diol-(2-furanil)-3-buteno	12.95
7	2-hexenoato de etilo	13.53
8	Ácido 3-tiofen-acético	13.93
9	Ácido ftálico-2-etil-butil éster	27
10	4-fenil-1,2-di-(4-metoxifenil)-eteno.	35.88

modo de ionización por impacto electrónico (70 eV); y escaneo completo (35/500 m/z). La identificación de los componentes presentes en la muestra (Tabla 2) se realizó mediante comparación computarizada de los espectros de masas de la biblioteca NIST (National Institute Standard and Technology).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El extracto etanólico fue de color púrpura y después de evaporar el disolvente se realizaron pruebas de solubilidad, logrando disolverlo en carbonato de sodio 0.5 M. Posteriormente se realizó una extracción líquido-líquido con hexano. Después de eliminar el hexano de la fracción orgánica se obtuvo un líquido denso de color amarillo y aroma agradable que solidificó a la temperatura de refrigeración. El efecto del extracto etanólico y la fracción hexánica sobre las bacterias y la levadura se muestra en la Tabla 1. La concentración mínima inhibitoria (MIC) en el extracto completo sobre *Salmonella typhi* (ATCC 6539) fue de 0.625 mg/mL y en la fracción hexánica fue de 0.0781 mg/mL. El MIC del extracto completo sobre *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) fue de 1.25 mg/mL, mientras que para la fracción hexánica fue de 0.625

mg/mL. *Salmonella typhi* está presente en la disentería en tanto que *S. typhimurium* es uno de los serotipos que es aislado con más frecuencia en México (Hernández-Cortez *et al*, 2011). El extracto etanólico no afectó a concentraciones de 5.0 mg/mL el crecimiento de *C. albicans* (ATCC 10231). Reportes previos indican que el extracto etanólico de las hojas en concentraciones de 0.375 mg/disco (Jacobo-Salcedo *et al*, 2011) y 2.0 mg/disco (Murillo *et al*, 2001) no inhiben el crecimiento de esta levadura. Sin embargo, la fracción hexánica inhibió el crecimiento de *C. albicans* con MIC de 0.25 mg/mL. Nuestros datos muestran que el extracto etanólico inhibió la proliferación de *Escherichia coli* (ATCC 8739) con MIC de 2.5 mg/mL. Otros autores han reportado que el extracto etanólico en concentraciones de 0.375 mg/disco (Jacobo-Salcedo *et al*, 2011) no inhibe el crecimiento de *E. coli* (ATCC 412352) y de 2.0 mg/disco no inhibe el crecimiento de *E. coli* (ATCC 25922) (Murillo-Álvarez *et al*, 2001). La cepa empleada es diferente además de que los dos grupos de trabajo emplearon la técnica de difusión en agar en tanto que nosotros empleamos un método de dilución que nos permitió evaluar la actividad del extracto en diversas concentraciones, incluso más altas que la probada por dichos grupos de trabajo.

Tanto el extracto completo como su fracción hexánica inhibieron el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) con MIC de 1.25 mg/mL. De acuerdo al trabajo reportado por el grupo de Jacobo-Salcedo, el extracto etanólico en concentración de 0.375 mg/disco no inhibe el crecimiento de *S. aureus* (ATCC3090014). El extracto etanólico en una concentración de 2.0 mg/disco no inhibe el crecimiento de *S. aureus* (Murillo, *et al.*, 2001). Sin embargo, en este reporte no indican las características de la cepa de *Staphylococcus* empleada y quizás a esto se deba la discrepancia de resultados, ya que la susceptibilidad a los fármacos varía entre las diferentes cepas (Hernández-Cortéz *et al.*, 2011).

Cabe mencionar que las características del suelo así como las condiciones climatológicas en las que crecieron las plantas fueron distintas ya que estas se colectaron en Cd. Valles SLP (Jacobo-Salcedo *et al.*, 2011) y La Paz BCS (Murillo *et al.*, 2001), por lo que es probable que existan variaciones en la concentración de los metabolitos secundarios presentes en dichas plantas.

Los componentes detectados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se muestran en la Tabla 2. Mediante el empleo de la base de datos NIST se identificaron 10 compuestos. El 4-metil-3-pentenal es un compuesto minoritario de la fracción hexánica que se obtuvo en un tiempo de retención de 4.1 min. Este compuesto es uno de los constituyentes del aceite esencial obtenido de hojas de *Ipomoea batata* L. (Wang *et al.*, 2010). La actividad antibacteriana de nuestra fracción podría estar relacionada con la presencia de 4-metil-3-pentenal ya que otros investigadores han reportado que el hexanal aislado de *Olea europaea* tiene actividad antimicrobiana general (Domingo y López-Brea, 2003).

Se detectó el éster 2-hidroxi-2-metilbutanoato de metilo, con tiempo de retención de 4.77 min. Este es un compuesto volátil con característica olfativa presente en la piña (Sinuco *et al.*, 2004).

El ácido 2-hidroxi-2-metilbutanoíco se detectó a los 7.21 min., compuesto que se encuentra presente en el extracto etanólico de las flores de *Hibiscus rosa sinensis* (Anisha *et al.*, 2011).

El 1,2-diol-(2-furanil)-3-buteno se detectó a los 12.45 min, compuestos análogos se han detectado entre los compuestos volátiles de *Ipomea batata* (Wang *et al.*, 2010). También se han reportado compuestos derivados del furano como compuestos volátiles asociado con el olor de la cereza (Sinuco *et al.*, 2004). A la fecha se desconoce el efecto de este tipo de compuesto sobre la viabilidad bacteriana.

Se han aislado de *J. spicigera* los flavonoides camferitrina, y su triramnósido (Euler & Alam, 1982) y la camferitrina (II) (Domínguez *et al.*, 1990). Otros compuesto aislados son el  $\beta$ -sistosterol, el 3-O-glucósido de  $\beta$ -sistosterol, la alantoina, la crip-taxantina y una antocianina muy polar que presenta el comportamiento fluorescente de las infusiones de esta planta (Domínguez *et al.*, 1990).

Los grupos químicos más importantes con actividad antimicrobiana obtenidos de plantas son los fenoles, quinonas, taninos, cumarinas, flavonas y alcaloides y en menor proporción se reportan a los aldehídos, saponinas, sulfóxidos y alcanos (Domingo & López-Brea, 2003). Dentro de los compuestos reportados por nosotros está el aldehído 4-metil-3-pentenal y probablemente éste podría ser uno de los compuestos que podría contribuir a la inhibición de los microorganismos presentada por la fracción hexánica.

## CONCLUSIONES

Tanto el extracto etanólico como su fracción hexánica inhiben el crecimiento de los microorganismos causantes de la disentería y el mejor efecto lo presenta la fracción hexánica. Sólo la fracción hexánica inhibió el crecimiento de la levadura *C. albicans*,

agente causal del 86-90% de las infecciones superficiales o sistémicas. Este estudio muestra que *Justicia spicigera* posee interesantes propiedades antimicrobianas y

antimicóticas, lo cual explica el uso de esta planta en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

---

## REFERENCIAS

- Andrade-Cetto, A. (2009). Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, México. *Journal of Ethnopharmacology* **122**:163-171.
- Anisha, B., Nithya, V., Vidya, V.G. (2011). Phytochemical screening and in vitro antioxidant activities of the ethanolic extract of *Hibiscus rosa sinensis* L. *Annual of Biological Research*. **2**:653-661.
- Cáceres, A., Giron, L.M., Alvarado, S.R., Torres, M.F. (1987). Screening of antimicrobial activity of plants used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal Diseases. *Journal Ethnopharmacology* **20**:228-237.
- Cáceres-Cortés, J.R., Cantú-Garza, F., Mendoza-Mata, M.T., Chávez-González, G., Ramos-Mandujano, M., Zambrano-Ramírez, I.R. (2001). Cytotoxic activity of *Justicia spicigera* is inhibited by bcl-2 proto-oncogene and induces apoptosis in a cell cycle dependent fashion. *Phytotherapy Research* **15**:691-697.
- Domingo, D., López-Brea, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia* **16**:385-393.
- Domínguez, X.A., Achenback, H., Conzález, C.C., Ferré-D'Amare, A.R. (1990). Estudio químico del muitle (*Justicia spicigera*). *Revista Latinoamericana de Química* **21**:142-143.
- Euler, K.L., Alam, M. (1982). Isolation of kaempferitrin from *Justicia spicigera*. *Journal of Natural Products*. **45**:220-221.
- Gomez-Verja, J.C., Reyes-Chilpa, R., Aguilar, M.I. (2012). Chemistry and pharmacology of selected Asian and American Medicinal species of *Justicia*. En "Bioactive Phytochemicals. Perspectives for Modern Medicine. Vol. I.". Gupta, V.K. Editor. India Daya Publishing House. New Delhi, India. 1<sup>a</sup> edición. P.p. 455-473.
- Heinrich, M, Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E.M. (2004). Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy. Churchill. Livingstone, Edinburgh, UK. Pp 245-252.
- Hernández -Cortéz, C., Aguilera, A.M.G. Castro, E.G. (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* **31**:137-151.
- Hernández, F. (1790). De Historia Plantarum Plantae Novae. Ed. Matritence. Pp 155. Madrid.
- Herrera-Arellano, A., Jaime-Delgado, M., Herrera-Alvarez, S., Oaxaca-Navarro, J., Salazar-Martínez, E. (2009). Uso de terapia alternativa/complementaria en pacientes seropositivos a VIH. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* **47**:651-658.
- Ibarra-Moreno, S., Ibarra-Velarde, F., Avila-Acevedo, G. (2012). *In vitro* evaluation of fasciolicide activity with hexane, methanol and ethyl acetate with extracts processed and obtained from some Mexican plants used in traditional medicine based on ethno botanical studies. *American Journal of Plant Sciences* **3**:506-511.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2012. Estadísticas a propósito del día del niño.
- Jacobo-Salcedo, M.R., Alonso-Castro, A.J., Salazar-Olivo, L.A., Carranza-Alvarez, C., González-Espíndola, L.A., Domínguez, F., Maciel-Torres, S.P., García-Luján, C., González-Martínez, M.R., Gómez-Sánchez, M., Estrada-Castillón, E., Zapata-Bustos, R., Medellín-Milán, P., García-Carranca, A. (2011). Antimicrobial and cytotoxic effects of Mexican medicinal plants. *Natural Product Communication* **6**:1925-1928.

- Liu, M., Seidel, V., Katerere, D.R., Gray, A.I. (2007). Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeast. *Methods* **42**:325-329.
- Murillo-Alvarez, J.I., Encarnación, D.R., Franzblau, S.G. (2001). Antimicrobial and cytotoxic activity of some medicinal plants from Baja California Sur (México). *Pharmceutical Biology* **39**:445-449.
- Ponce-Macotela, M., Rufino-González, Y., De la Mora, J.I., González-Maciel, A., Reynoso-Robles, R., Martínez-G.M.N. (2001). Mortality and morphological changes in *Giardia duodenalis* induced by exposure to ethanolic extracts of *Justicia spicigera*. *Proceeding Western Pharmacolgy Society* **44**:151-152.
- Rios, M., Aguilar, B., Navarro, V. Two new benzofuranes from *Eupatorium aschenbornianum* and their antimicrobial activity. *Planta Medica* 2003; **69**:967-970.
- Sarker, S, D., Nahar, L., Kumarasamy Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* anti-bacterial screening phytochemicals. *Methods* **42**:321-324.
- Sinuco, D.C., Morales, A.L., Duque, C. 2004. Componentes volátiles libres y glicosídicamente enlazados del aroma de la piña (*Ananas comosus L.*). *Revista Colombiana de Química* **33**:47-56.
- Vega-Avila, E., Espejo-Serna, A., Alarcón-A, F., Velasco-Lezama, R. (2009). Cytotoxic activity of four Mexican medicinal plants. *Proceedings of the Western Pharmacology Society* **52**:78-82.
- Wang, M., Xiong, Y., Zeng, M., Li, H., Zhang, T., Liang, Y. (2010). GC-MS combined with chemometrics for analysis of the components of the essential oils of sweet potato leaves. *Chromatographia* **71**:891-897.